

DESARROLLO DE UN NUEVO BIOENSAYO PARA DETECCIÓN DE TOXINAS MARINAS EN MOLUSCOS BIVALVOS UTILIZANDO EL MODELO DEL PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*)

DEVELOPMENT OF A NEW ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) MODEL BIOASSAY FOR DETECTION OF MARINE BIOTOXINS IN BIVALVE SHELLFISH

Nicolás Fellenz, Lucrecia Piñuel, Patricia Boeri, Carolina Fernández, Natalia Barrio y Daniel Barrio
(Departamento de Ciencias Exactas, Naturales y de Ingeniería de la Sede Atlántica, de la Universidad Nacional de Río Negro)

Resumen

La extracción, producción y procesamiento de moluscos bivalvos presenta un inconveniente para la calidad e inocuidad agroalimentaria, dado que pueden estar contaminados con toxinas marinas. El consumo de mariscos contaminados con dichas sustancias provoca intoxicaciones graves y constituye un problema para la salud de la población. Por eso, es necesario contar con un método rápido, sensible y específico para determinar su presencia. El bioensayo en ratón, establecido como método oficial por la asociación de comunidades analíticas –Association of Analytical Communities (AOAC 2012)–, es el utilizado; sin embargo la polémica en torno al uso de mamíferos en ensayos, sumada a los problemas y limitaciones inherentes a su realización, han impulsado el desarrollo de otros métodos.

El objetivo de este proyecto es desarrollar un bioensayo para la detección de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos empleando el modelo del pez cebra. El embrión del pez cebra (*Danio rerio*) es ampliamente utilizado como modelo vertebrado de estudio para ensayos toxicológicos. Este sistema se aplica cada vez más para el estudio de toxinas marinas. Las ventajas del modelo son la simplicidad y economía de mantenimiento y reproducción y el bajo cuestionamiento social a su uso.

Para el desarrollo del bioensayo se realizarán curvas dosis-respuesta con extractos de moluscos bivalvos con toxina y sin ella evaluados previamente por el método del ratón y por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Se determinará la dosis letal mediana (DL50) y los cambios morfológicos producidos por la toxina a fin de establecer los parámetros y condiciones del ensayo. Una vez definido un protocolo de trabajo, se validará (selectividad, linealidad, sensibilidad, límites, rango, precisión, veracidad, robustez y aplicabilidad) y contrastará con el ensayo del ratón y los resultados de la HPLC.

Summary

Shellfish extraction, production and processing poses an inconvenience for quality and food safety, because the product may be contaminated with marine toxins. The consumption of toxin-contaminated shellfish produces severe poisoning, being a problem for the human health. That is why it is necessary to have a rapid, sensitive and specific method to determine the presence of these substances. The mouse bioassay is the standard method (AOAC 2012), but the controversy around the use of mammals in testing, and the problems and limitations of its implementation, has promoted the development of new methods.

The aim of this project is to develop a bioassay for detecting marine toxins in shellfish using the zebrafish model.

The zebrafish (*Danio rerio*) embryo is widely used as a vertebrate model for toxicological studies. This system is increasingly applied to the study of marine toxins. The advantages of the model are the simplicity and economy of its maintenance and reproduction, and the low social opposition to its use.

To develop the bioassay, we will perform dose-response curves with shellfish extracts –with and without toxin– previously evaluated by both the mouse method and HPLC. The lethal dose (LD50) and the morphological changes produced by the toxin will be determined in order to establish test parameters and conditions. Then, we will define a working protocol and it must be validated (selectivity, linearity, specificity, limits, range, precision, accuracy, robustness and applicability) and contrast with the mouse assay and HPLC results.

The incorporation of this model by toxicology laboratories, additionally allows the adoption of new techniques for toxicological testing of food, sewage and other matrices.

Keywords: harmful algal blooms, marine biotoxins, zebrafish, bivalve shellfish.

La instalación de este modelo vertebrado en los laboratorios de toxicología permitiría adicionalmente la adopción de nuevas técnicas para la realización de ensayos toxicológicos en alimentos, aguas residuales y otras matrices.

Palabras clave: marea roja, biotoxinas, pez cebra, moluscos bivalvos.

Introducción

Este trabajo se enmarca dentro de los proyectos de investigación, transferencia y comunicación en sanidad, calidad e inocuidad agroalimentaria que el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa) financia y promueve desde 2013 a partir de los “Premios Senasa”.

El objetivo de estos premios es promocionar, generar conocimientos y materiales formativos, para fortalecer de este modo la prevención, el diagnóstico, el control y la erradicación de trastornos y enfermedades zoonóticas. Dentro de la categoría “Investigación y transferencia en calidad e Inocuidad Alimentaria de Equipos en Formación”, el Departamento de Ciencias Exactas, Naturales y de Ingeniería de la Sede Atlántica de la Universidad Nacional de Río Negro presentó este proyecto y resultó elegido en primer lugar.

El equipo en formación que trabaja en el Departamento antes citado está desarrollando un nuevo bioensayo para detectar aquellas toxinas marinas que se hacen presentes en moluscos bivalvos, utilizando para esto el modelo del pez cebra (*Danio rerio*).

Este equipo entiende que, dentro de la producción agroalimentaria de la costa atlántica argentina, existe un conjunto de alimentos que requiere de una vigilancia más exhaustiva, dado que representan una potencial amenaza para la salud humana. En particular, todos los lotes de moluscos bivalvos deben ser controlados para garantizar su calidad e inocuidad, debido a que pueden estar contaminados con toxinas marinas. El origen de estas sustancias son las floraciones algales nocivas, conocidas como “marea roja” debido a que se desarrollan proliferaciones de microorganismos planctónicos pigmentados entre los que se encuentran microalgas, ciliados y bacterias. Los síndromes tóxicos más conocidos causados por microalgas son la Intoxicación Paralizante por Marisco (PSP), la Intoxicación Diarreica por Marisco (DSP), la Intoxicación Amnésica por Marisco (ASP) y la Intoxicación Neurotóxica por Marisco (NSP) (Sar *et al.*, 2002).

Los episodios tóxicos asociados al consumo de mariscos constituyen un problema para la seguridad ali-

mentaria dado que en la mayoría de los casos causan la muerte, por ello es necesario contar con un método rápido, sensible y específico para determinar el contenido y la presencia de toxinas. El bioensayo en ratón es el método oficial utilizado (AOAC 2012); sin embargo, la polémica en torno al uso de mamíferos en ensayos y los costos y limitaciones inherentes a su realización impulsan el desarrollo de nuevos métodos. Actualmente se está trabajando en diferentes estrategias y modelos entre los que se incluyen ensayos farmacológicos, inmunoensayos, ensayos químicos o de separación y bioensayos alternativos para mejorar la confiabilidad, precisión y especificidad, así como disminuir los costos (Etheridge, 2010; Berry *et al.*, 2007; Mons *et al.*, 1998). Los métodos químicos (HPLC) tienen la capacidad de discriminar gran parte de las toxinas, sin embargo no es posible identificar todas. Además, es una metodología que requiere de equipamiento complejo y costoso y de personal calificado, lo cual limita su adopción por la mayoría de los laboratorios. Los métodos inmunológicos (ELISA, RIA, EIA) son precisos y específicos, pero tienen un alto costo y baja efectividad (Ben-Gigirey y Villar-González, 2008).

El embrión del pez cebra (*Danio rerio*) es ampliamente utilizado como modelo vertebrado de estudio en diferentes áreas del conocimiento, el *screening*, la búsqueda de nuevas drogas y la toxicología (Nagel, 2002; Spitsbergen y Kent 2003; Hill *et al.*, 2005). Las ventajas del modelo son la simplicidad y la economía de mantenimiento y reproducciones, es posible contar con 200 embriones semanales por hembra. Los ensayos pueden realizarse en platos de 96 pocillos y es necesaria poca cantidad de toxina para el estudio. Además, es posible realizar ensayos rápidos en adultos utilizando diferentes vías de administración. Este sistema se aplica cada vez más para el estudio de toxinas microbianas y más específicamente se ha empleado para investigar toxinas marinas (Tiedeken, 2005; Lefebvre *et al.*, 2004 y 2009; Purdie, 2009). Estas características convierten al pez cebra en un modelo vertebrado muy versátil y apto para los estudios *in vivo* de toxicidad. La instalación de este modelo ver-

tebrado en los laboratorios de toxicología permitiría, adicionalmente, la adopción de nuevas técnicas para la realización de ensayos toxicológicos en alimentos, aguas residuales y otras matrices (Scholz *et al.*, 2008).

Objetivos y resultados esperados

El objetivo general de esta iniciativa es desarrollar un bioensayo para la detección de toxinas marinas en moluscos bivalvos utilizando el modelo del pez cebra. Se evaluarán diferentes estrategias para seleccionar el modelo que presente mejor reproducibilidad, exactitud, robustez y simplicidad. Se usarán distintos estados de desarrollo del pez cebra (embriones, larvas, juveniles y adultos) así como también diferentes vías de administración de los extractos por ensayar (incorporación en el agua de cultivo, administración oral e inyección intraperitoneal).

Los estudios con embriones y larvas se harán incorporando distintas dosis del extracto de bivalvos en agua de cultivo. Se espera obtener los valores de DL50 para las toxinas y así poder establecer la mínima concentración detectable y el rango de trabajo del método. En los ensayos se identificarán diferentes cambios morfológicos y de comportamiento entre los cuales se esperan: coagulación, malformación de somitos, no despegado de la cola, curvatura corporal, retraso en el desarrollo, ataxia, convulsiones, edemas y muerte.

Por otro lado, se analizarán métodos que utilizan peces juveniles y adultos, y en estos casos se usarán tres vías de administración (oral, tópica e intraperitoneal). En todos los casos se evaluará la dosis que cause cambios en el comportamiento tales como ataxia, convulsiones, nado defectuoso o muerte. Se registrarán los tiempos y dosis mínimas para causar alguno de los defectos mencionados.

A partir de los resultados obtenidos se propondrá un protocolo donde se establecerá: preparación de los extractos, las diluciones por ensayar, tiempos y condiciones de incubación, tipo y número de individuos por ensayo, parámetros por evaluar, cálculos y modo de presentación de los resultados. En la validación del método se espera obtener la selectividad, linealidad, sensibilidad, límites, rango, precisión, veracidad, robustez y aplicabilidad.

Metodología

Preparación de los extractos: Los extractos por utilizar serán obtenidos por el Laboratorio de Salud Ambiental de Viedma (Centro de Biología y Toxicología

Aplicada de Viedma, Río Negro) siguiendo la metodología oficial (AOAC) y serán evaluados por el método del ratón. Brevemente, las toxinas se extraen de los tejidos blandos de los bivalvos, previa homogeneización de estos. Para obtener la toxina paralizante, saxitoxina y sus congéneres, se realiza una extracción acuosa ácida y para la toxina diarreica, ácido okadaico y sus análogos, se recurre a una extracción con solventes orgánicos. El proyecto se iniciará con la búsqueda de estas toxinas y luego se extenderá a otras halladas con menor frecuencia en la región.

Mantenimiento de peces cebra para la producción de huevos fertilizados: Los peces cebra de la cepa *wt* AB de 4 a 12 meses de edad serán mantenidos en peceras con agua pura libre de cloro a una temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ con sistema de burbujeo de aire para mantener una saturación de oxígeno. Los reproductores serán criados en una relación de 1 hembra cada 2 machos en una pecera con 1 pez por litro de agua con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Los peces serán alimentados una vez al día con artemias (*Artemia naupli*) y 2 a 3 veces por día con alimento liofilizado comercial.

Evaluación de la toxicidad in vivo de los extractos: Huevos fertilizados del pez cebra (embriones) o larvas (peces de 5 a 10 días) serán expuestos en placas de 24, 48 o 96 pocillos en un rango definido de 5 concentraciones de extracto por ensayar. El ensayo con embriones se inicia inmediatamente luego de la fertilización y es continuado por 48 h. Se determinan 4 estadios característicos del desarrollo de los embriones y son comparados con los testigos, los cuales no se exponen a extractos por ensayar. Pueden detectarse con este modelo aquellas sustancias que producen inhibición o retardo del crecimiento celular, efectos letales o embrio-tóxicos en función de la concentración. Luego es posible determinar los parámetros DL50, concentración más alta a la que no se observan efectos (NOEC por sus siglas en inglés) y concentración más baja a la que se observan efectos (LOEC por sus siglas en inglés).

El ensayo se llevará a cabo de acuerdo con lo descrito en las guías de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE, 2006). Brevemente, en una placa multipocillo se agregarán las diferentes diluciones de los extractos por ensayar. Se reservarán pocillos para los testigos sin el agregado de ninguna sustancia y con vehículo. Los huevos fertilizados se colocarán en los pocillos de la placa con la asistencia de una pipeta Pasteur. Luego, a las 24 y 48 h de exposición se evaluarán las siguientes características (*apical endpoints*): número de huevos coagu-

lados, irregularidades en la formación de somitos, no despegado de la cola, la ausencia del corazón latiendo, edemas y malformaciones en general. Los embriones serán considerados muertos ante la observación de una de las características descriptas. Para el caso de las larvas se analizará el tiempo y la concentración necesarios para producir ataxia, convulsiones, nado defectuoso o muerte.

Los juveniles y adultos serán sometidos a diferentes concentraciones de toxina para hallar la dosis y el tiempo en que se produce ataxia, convulsiones, nado deficiente o muerte. Las toxinas puras o los extractos se administrarán en el agua de cultivo o por vía intraperitoneal. En el primer caso, se prepararán soluciones de distintas concentraciones y luego los peces serán introducidos en ellas y, en el segundo, se aplicarán inyecciones intraperitoneales con dosis crecientes de toxina. Posteriormente, se evaluará el comportamiento de los peces y se registrarán los tiempos y dosis mínimas necesarias para causar un efecto tóxico detectable, como se especificó previamente.

Validación de la metodología: Se evaluará la linealidad, el límite de detección y el de cuantificación, el porcentaje de recuperación, el rango de trabajo (errores aleatorios, sistemático y rango), la precisión (desvío estándar –SD–, coeficiente de variación –CV–), veracidad (selectividad y recuperación), la robustez y la aplicabilidad. Para ello se realizarán diferentes repeticiones de los ensayos con distintos analistas con el protocolo propuesto.

Tratamiento de los resultados: Los resultados serán evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA), la prueba t de student y el método de Probit. Para los ensayos con peces se graficará el porcentaje acumulativo de la mortalidad en función del logaritmo de la concentración. Los valores de DL50 (con un 95 % de confianza), NOEC y LOEC serán calculados a partir de este gráfico.

Bibliografía

AOAC INTERNATIONAL (2012), *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*, 19th Edition.

Ben-Gigirey B. y A. Villar-Gonzalez (2008), "Chemical analysis", *Seafood and Fresh water Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*, Botana, L. M. (ed.), CRC Press, Taylor and Francis Group LLC, pp. 177-196.

Berry, J. P.; Patrick, M. G.; Gibbs, D. L. y M. C. Schmale (2007), "The zebrafish (*Danio rerio*) embryo as a model system for identification and characterization of developmental toxins from marine and freshwater microalgae", *Comparative Biochemistry and Physiology. Part. C: Toxicology and Pharmacology* vol. 145, n.º 1, pp. 61-72.

Etheridge, S. M. (2010), "Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives", *Toxicon* vol. 56, n.º 2, pp. 108-122.

Hill, A. J.; Teraoka, H.; Heideman, W. and R. E. Peterson (2005), "Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity", *Toxicological Sciences*, vol. 86, n.º 1, pp. 6-19.

Lefebvre, K. A.; Trainer, V. L. and N. L. Scholz (2004), "Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin", *Aquatic Toxicology*, vol. 66, n.º 2, pp. 159-170.

Lefebvre, K. A.; Tilton, S. C.; Bammler, T. K.; Beyer, R. P.; Srinouanprachan, S.; Stapleton, P. L.; Farin, F. M. y E. P. Gallagher (2009), "Gene Expression Profiles in Zebrafish Brain after Acute Exposure to Domoic Acid at Symptomatic and Asymptomatic Doses", *Toxicological Sciences*, vol. 107, n.º 1, pp. 65-77.

Mons, M. N.; Van Egmond, H. P. y G. J. A. Speijers (1998), "Paralytic shellfish poisoning: A review", RIVM Report 388802 005, *Repositorio de documentos del Instituto Nacional de Salud Pública y Ambiente de Holanda* [en línea]. Dirección URL: <http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/10000/1/388802005.pdf?origin=publication_detail>.

Nagel, R. (2002), "DaT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio* a general model in ecotoxicology and toxicology", *Altex*, n.º 19, supl. 1/02, pp. 28-38.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2006), *Guidelines for the testing of chemicals*.

Purdie, E. L.; Samsudin, S.; Eddy, F. B. y G. A. Codd (2009), "Effects of the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine on the early-life stage development of zebrafish (*Danio rerio*)". *Aquatic Toxicology*, vol. 95, n.º 4, pp. 279-284.

Sar, A. A.; Ferrario, M. E. y B. Reguera (eds.) (2002), *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*, Instituto Español de Oceanografía.

Scholz, S.; Fischer, S.; Gundel, U.; Küster, E.; Luckenbach, T. y D. Voelker (2008), "The zebrafish

embryo model in environmental risk assessment-applications beyond acute toxicity testing”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 15, n.º 5, pp. 394-404.

Spitsbergen, J. M. y M. L. Kent (2003), “The state of the art of the Zebrafish model for toxicity and toxicologic pathology research advantages and current limitations”, *Toxicologic Pathology*, vol. 31, n.º 1 (suplem), pp. 63-87.

Tiedeken, J. A.; Ramsdell, J. S. y A. F. Ramsdell (2005), “Developmental toxicity of domoic acid in zebrafish (*Danio rerio*)”, *Neurotoxicology and Teratology*, vol. 27, n.º 5, pp. 711-717.